

新型蛋白质配体-亲和体研究进展

李 爽 郝志明*

(西安交通大学医学院第一附属医院, 西安 710061)

摘要 亲和体(affibody)是一种衍生于葡萄球菌 A 蛋白 B 结构域的人工蛋白质分子。B 结构域含 58 个氨基酸, 形成 3 个 α 螺旋结构, 分子质量约为 6.5 ku。其中第一及第二螺旋中的 13 个特定位点的氨基酸对其结构无明显影响, 这些位点可被随机突变形成理论上可与任何靶分子结合的亲和体文库。筛选该文库可获得能与某一靶分子特异结合的亲和体。亲和体与靶分子的结合特性与抗体相似, 但与抗体相比具有一些独特的优势, 如: 通过体外筛选即可获得, 以化学合成方法或原核表达即可大量制备, 分子质量小、在生物体内组织穿透性强、血浆清除率高, 理化稳定性好, 可以通过交联或融合表达与标记分子(如荧光蛋白、生物素等)结合而不影响其与靶分子的结合能力。亲和体可作为抗体的替代品, 用于蛋白质识别、分离及纯化、实验诊断、分子显像及靶向治疗。

关键词 亲和体, 人工突变, 体外筛选, 分子影像学

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00269

亲和体(affibody)是葡萄球菌属蛋白 A (staphylococcal protein A, SPA) B 结构域的人工突变体, 具有与其他蛋白质结合的能力, 是一种新型的蛋白质配体^[1]。SPA 是 A 型金黄色葡萄球菌的一种细胞壁蛋白, 含有 S、E、D、A、B、C、X 等 7 个结构域, 其中 B 结构域含 58 个氨基酸, 形成 3 个 α 螺旋结构, 分子质量约为 6.5 ku, 是介导 SPA 与 IgG(IgG3 除外)的 Fc 段结合的主要功能片段^[2]。SPA 与 IgG Fc 段结合并不干扰 Fab 段与抗原结合, 可形成 A 蛋白-抗体-抗原复合物, 常用于识别及分离 IgG。1995 年瑞典学者 Nord 等^[3]合成 B 结构域核酸序列, 改称为 Z 结构域, Z 结构域的第一及第二螺旋结构中特定的 13 个位点(Q9, Q10, N11, F13, Y14, L17, H18, E24, E25, R27, N28, Q32, K35)的氨基酸组成对 Z 结构域的高级结构无明显影响, 将这些位点随机突变后构建的肽文库, 理论上含有可与任意目标蛋白结合的分子, 经亲和筛选后可得到与某一特定分子结合的亲和体^[4]。迄今为止, 已筛选出如 Taq DNA 多聚酶、人胰岛素、人载脂蛋白 A-1 变异体、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、人类表

皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF α)、 β 淀粉样肽(amyloid- β , A β)、IL-8、gp120、CD28、IgA、IgE 及 IgM 等多种蛋白质的亲和体^[5]。亲和体的骨架结构及已筛选出的 A β 、TNF α 、HER2、EGFR、PDGF、HER3 蛋白质分子的亲和体为 Affibody 公司的专利产品。由于亲和体来源于 Z 结构域, 因此以“Z”命名, 如 HER2 亲和体命名为 Z_{HER2.4}, 其中“4”代表克隆序号; HER2 亲和体二价体命名为(Z_{HER2.4})₂; 若在亲和体氨基端融合白蛋白结合结构域(ABD), 则命名为 ABD-Z_{HER2.4}。

亲和体在特异性及亲和力等方面与抗体相似, 但在筛选、制备及实际应用中具有独特优势: a. 可以用体外筛选的方法获得, 时间短、过程简单; b. 通过优化可获得热稳定性、化学稳定性、复性效率及亲水性等更好的亲和体, 如 23 位置突变为

* 通讯联系人。

Tel: 18991232223, E-mail: haozhm@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-06-15, 接受日期: 2011-08-22

丝氨酸的 HER2 亲和体, T_m 值明显增加, 该分子加热至 90℃ 冷却至室温 3 个循环后仍具有亲和能力, 同时其亲水性也有所增强^[9]; c. 分子质量小, 可直接经化学方法合成, 且化学合成的亲和体精确度高、重复性强、不易形成生产批次差异; d. 一级结构中不含有二硫键, 重折叠时间仅为 3 μ s, 具有较强的复性能力, 可应用原核表达系统大量制备; e. 荧光素、生物素等报告基团可精确交联或融合在亲和体特定位置而不影响其亲和能力; f. 亲和体在生物体内血浆清除率高, 组织穿透性强, 不易产生非特异性结合. 基于以上特点, 亲和体有望替代抗体广泛应用于生物技术、临床诊断及治疗等领域.

1 亲和体的筛选及制备

目前噬菌体展示技术、细胞展示技术、核糖体展示技术及蛋白质互补分析技术等均有应用于体外筛选亲和体的报道, 其中噬菌体展示技术应用最为广泛. 噬菌体展示技术是以改构的噬菌体为载体, 把亲和体的基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白质基因区, 使亲和体与噬菌体外膜蛋白融合表达, 并展示在噬菌体颗粒的表面, 通过亲和筛选获得相应编码基因. Nord 等^[3, 7-8]设计并合成亲和体 DNA 文库, 将 DNA 文库插入噬菌体质粒 pAffi1, 制备噬菌体文库 Zlib2002, 容量约为 3×10^9 . 该文库起初用于筛选理化性质更稳定的 IgG Fc 段的亲和蛋白, 近年来已应用于 EGFR、HER2、A β 等多种目标分子亲和体的体外筛选工作.

细胞展示技术也有用于筛选亲和体的报道, 以筛选 TNF α 亲和体为例, 亲和体文库在革兰氏阳性细菌 - 肉葡萄球菌中表达并展示在细胞表面, 再与标记后的目标分子 TNF α 混合. 流式细胞仪分选出与 TNF α 高度亲和的细胞, 分选后的细胞即可用于测序分析以确定亲和体序列^[9], 而且可以通过分离纯化直接从细菌表面获得亲和体.

核糖体展示技术(ribosome display technology, RDT)是一种不依赖细胞的筛选技术, 文库构建过程不受转染效率影响, 因此文库多样性及筛选效率得到很大提高. 如 IgG₁ Fab 段的亲和体 Z_{mab25} 即采用 RDT 筛选获得的^[10]. 正确折叠的亲和体及其 mRNA 同时结合在核糖体上, 形成 mRNA-核糖体-蛋白质复合物, 将亲和体的基因型和表型联系起来. 亲和体核糖体展示文库与靶分子混合后, 通过分析靶分子亲和的复合物 mRNA 信息确定亲

和体序列^[11].

蛋白质互补分析(protein complementation assay, PCA)是指目的蛋白与配体相结合时, 各自携带的报告基团相互靠近即发出信号, 用于蛋白质相互作用分析. 应用该技术进行筛选时目标蛋白与亲和体文库在同一细胞内共表达, 避免了目标蛋白的制备及纯化等工作^[12], 如 Nygren 等^[13-14]将 TNF α 与 β 内酰胺酶氨基端片段融合, 制备表达质粒转化大肠杆菌, 将亲和体序列融合于 β 内酰胺酶的羧基端片段后插入噬菌体基因组, 制备高滴度噬菌体并感染带有 TNF α 质粒的大肠杆菌, IPTG 诱导 TNF α 与亲和体在细胞内共表达, TNF α 与亲和体结合后细胞获得 β 内酰胺酶活性, 在含有氨苄青霉素的半固体培养基上可筛选出抗性克隆并对其进行测序分析, 确定亲和体序列.

亲和体分子质量小, 可通过化学合成的方式获得, 单体一级结构中缺乏半胱氨酸, 也可通过大肠杆菌原核表达系统制备^[15], 将亲和体序列克隆至 pET 表达载体, 在 BL21(DE3)菌株中表达带有 His 标签的重组蛋白, 在变性条件下经 Ni-NTA 柱纯化获得. 高纯度重组亲和体蛋白去除变性剂后可高效快速重折叠成为具有正确高级结构的亲和体. 利用分子克隆技术还可将亲和体单体头尾相连构建二价体或多价体, 通过增加蛋白质结合的化合价明显减小解离速率, 如 Z_{HER2.4} 的解离系数 K_D 为 50 nmol/L, 而(Z_{HER2.4})₂ 的 K_D 为 3 nmol/L, 与靶分子的结合能力明显增强^[16]; 还可将亲和体与其他蛋白质分子如白蛋白结合结构域(albumin binding domain, ABD)、荧光蛋白、细菌毒素等融合表达发挥多重生物学作用.

2 亲和体的应用

2.1 生物技术

亲和体适用于目标蛋白检测、分离、纯化等生物技术. 亲和体与固相介质结合后, 可用于分离纯化目标蛋白; 与 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、或 IgG Fc 段等融合, 可在 ELISA、斑点杂交及免疫组织化学等实验中代替抗体检测目标蛋白^[17-18]; 融合细菌表面蛋白的人 IgA、IgE 亲和体可作为细胞分析工具用于凝集实验及免疫共沉淀等实验方法; 荧光素或荧光蛋白标记后可用于靶蛋白亚细胞定位或应用流式细胞仪对细胞进行检测、分选, 如带有荧光标签的 HER2 亲和体可用于定量检测 SKOV-3 移植瘤细胞细胞表面受体^[19]; 亲和体还可

作为生物传感器应用于荧光共振能量转移技术 (fluorescence resonance energy transfer, FRET). 另外, 有抑制靶分子活性的亲和体还可有某些特殊用途, 如 Taq 多聚酶亲和体作为多聚酶抑制剂应用于热启动 PCR 反应体系以阻止非特异性扩增.

2.2 分子影像学

经同位素标记后的亲和体作为分子示踪剂在 SPECT 及 PET 等影像学应用中具有极大优势^[20]. 亲和体的半衰期比正电子放射性核素或伽马放射性核素的半衰期短, 在仪器检测中特异性好, 检测效率高. HER2 亲和体最先应用于肿瘤显像诊断研究^[21], HER2 是一种穿膜蛋白, 是跨膜受体酪氨酸激酶家族成员, 在乳腺癌及卵巢癌中过度表达. 由 Zlib2004 噬菌体文库筛选获得 HER2 亲和体, 经细胞学实验证实该分子能够与卵巢腺癌细胞 SKOV-3 表面的 HER2 蛋白高效结合, 经 SKOV-3 移植瘤实验证实该分子经小鼠尾静脉注射后 30~60 min 即可在肿瘤组织中富集. HER2 亲和体在大鼠体内半衰期约 10~20 min, 经同位素 ^{18}F ($t_{1/2}$ 110 min)、 ^{68}Ga ($t_{1/2}$ 68 min)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2}$ 6 h)、 ^{111}In ($t_{1/2}$ 2.8 天) 等标记后半衰期相对延长. 经同位素标记后的亲和体经鼠尾静脉注射后 1 h 即在血液、相应的肿瘤组织、肝脏组织及肾脏富集, 在其他组织中分布很少. 随时间推移, 在血液与肝脏中的分布迅速衰减, 而在肿瘤组织中衰减相对较慢, 肿瘤组织及肾脏组织存在高信号影^[5]. 与抗体相比, 亲和体更适于作为放射性检测介质应用于影像学诊断. 尽管对抗体进行多种优化, 如制备 Fab、scFv、minibody 等, 但与亲和体相比, 仍具有较大分子质量, 组织穿透力差难以在实体瘤中充分富集, 体内血浆清除速度慢, 另外, 抗体及其片段容易在正常组织中如骨髓等形成非特异性分布, 易造成中毒症状.

2.3 临床治疗

针对靶分子活性中心的亲和体可封闭靶分子的生物活性, 用于临床治疗. $\text{A}\beta$ 在阿尔兹海默病的发病中起重要作用. 瑞典学者 Grönwall 及 Jonsson 等^[8]筛选出的 $\text{A}\beta$ 亲和体, 可有效识别及结合人血浆及血清标本中的 $\text{A}\beta$, 有可能为阿尔兹海默病的治疗提供新手段. EGFR 与细胞的增殖、凋亡、分化与迁移等生物学活性密切相关, 在上皮来源的肿瘤中 EGFR 过度表达, 封闭 EGFR 可延缓肿瘤细胞的生长. 以往阻断 EGFR 生物学活性的研究主要集中在 EGFR 单克隆抗体及 EGFR 酪氨酸激酶抑制物的制备工作中, EGFR 亲和体的出现可能为上皮来

源肿瘤的诊断及治疗等研究工作提供新的方法^[22]. 针对肿瘤特异性表达分子的亲和体可为杀伤肿瘤细胞提供靶向作用, 如融合免疫毒性蛋白、螯合放射性核素、嵌入生物微颗粒表面或展示于病毒颗粒表面等. 动物实验证明, 以 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 融合有免疫毒素 PE38 的 HER2 亲和体注射乳腺癌荷瘤小鼠 3~6 次以后, 乳腺癌移植瘤被根除; 脂双分子层嵌有 HER2 亲和体的脂质体可靶向杀伤高表达 HER2 的肿瘤细胞, 提高治疗效率^[23-26]. 亲和体还可结合细胞内转录因子等成分并阻止其生物学作用, 为治疗提供新手段^[27-28].

3 展 望

随着更多种亲和体的开发, 亲和体有望在生物技术、临床诊断及治疗领域替代抗体完成目标蛋白检测、分离及干预生物学等作用. 其半衰期短的缺点可以通过分子克隆技术制备二价体或融合其他蛋白质后被有效克服, 为临床应用研究奠定基础. 亲和体作为外源蛋白质分子具有免疫原性, 还有待于进一步研究克服.

参 考 文 献

- [1] Nilsson B, Moks T, Jansson B, *et al.* A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng*, 1987, **1**(2): 107-113
- [2] Brausted A C, Wells J A. Minimizing a binding domain from protein A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(12): 5688-5692
- [3] Nord K, Nilsson J, Nilsson B, *et al.* A combinatorial library of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Protein Eng*, 1995, **8**(6): 601
- [4] Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, *et al.* Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(8): 772
- [5] Löfblom J, Feldwisch J, Tolmachev V, *et al.* Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Lett*, 2010, **584**(12): 2670-2680
- [6] Feldwisch J, Tolmachev V, Lendel C, *et al.* Design of an optimized scaffold for Affibody molecules. *J Mol Biol*, 2010, **398**(2): 232-247
- [7] Friedman M, Nordberg E, Håjden-Guthenberg I, *et al.* Phage display selection of Affibody molecules with specific binding to the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *Protein Eng Des Sel*, 2007, **20**(4): 189-199
- [8] Grönwall C, Jonsson A, Lindström S, *et al.* Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid β peptides. *J Biotechnol*, 2007, **128**(1): 162-183
- [9] Kronqvist N, Löfblom J, Jonsson A. A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and

- flow cytometry. *Protein Eng Des Sel*, 2008, **21**(4): 247–255
- [10] Grimm S, Yu F, Nygren P A. Ribosome display selection of a murine IgG (1) Fab binding Affibody molecule allowing species selective recovery of monoclonal antibodies. *Mol Biotechnol*, 2011, **48**(3): 263–276
- [11] Hanes J, Plückthun A. *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(10): 4937–4942
- [12] Koch H, Gräfe N, Schiess R, *et al.* Direct selection of antibodies from complex libraries with the protein fragment complementation assay. *J Mol Biol*, 2006, **357**(2): 427–441
- [13] Löfdahl P A, Nord O, Janzon L, *et al.* Selection of TNF- α binding affibody molecules using a beta-lactamase protein fragment complementation assay. *New Biotechnol*, 2009, **26**(5): 251–259
- [14] Löfdahl P A, Nygren P A. Affinity maturation of a TNF α binding affibody molecule by Darwinian survival selection. *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, **55**(3): 111–120
- [15] Rönmark J, Hansson M, Nguyen T, *et al.* Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*. *J Immunol Methods*, 2002, **261**(1–2): 199–211
- [16] Steffen A C, Wikman M, Tolmachev V, *et al.* *In vitro* characterization of a bivalent anti-HER-2 affibody with potential for radionuclide-based diagnostics. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, **20**(3): 239–248
- [17] Rönmark J, Kampf C, Asplund A, *et al.* Affibody-beta-galactosidase immunoconjugates produced as soluble fusion proteins in the *Escherichia coli* cytosol. *J Immunol Methods*, 2003, **281**(1–2): 149–160
- [18] Lundberg E, Höiden-Guthenberg I, Larsson B, *et al.* Site-specifically conjugated anti-HER2 Affibody molecules as one-step reagents for target expression analyses on cells and xenograft samples. *J Immunol Methods*, 2007, **319**(1–2): 53–63
- [19] Lyakhov I, Zielinski R, Kuban M, *et al.* HER2- and EGFR-specific affiproboscopes: novel recombinant optical probes for cell imaging. *Chembiochem*, 2010, **11**(3): 345–350
- [20] Orlova A, Magnusson M, Eriksson T L, *et al.* Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule. *Cancer Res*, 2006, **66**(8): 4339–4348
- [21] Baum R P, Prasad V, Müller D, *et al.* Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic In-111-or Ga-68-labeled affibody molecules. *J Nucl Med*, 2010, **51**(6): 892–897
- [22] Tolmachev V, Orlova A, Pehrson R, *et al.* Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a Lu-177-labeled HER2-specific affibody molecule. *Cancer Res*, 2007, **67**(6): 2773–2782
- [23] Alexis F, Basto P, Levy-Nissenbaum E, *et al.* HER-2-targeted nanoparticle-affibody bioconjugates for cancer therapy. *Chem Med Chem*, 2008, **3**(12): 1839–1843
- [24] Magnusson M K, Henning P, Myhre S, *et al.* Adenovirus 5 vector genetically re-targeted by an affibody molecule with specificity for tumor antigen HER2/neu. *Cancer Gene Ther*, 2007, **14**(5): 468–479
- [25] Myhre S, Henning P, Granio O, *et al.* Decreased immune reactivity towards a knobless, affibody-targeted adenovirus type 5 vector. *Gene Ther*, 2007, **14**(4): 376–381
- [26] Belousova N, Mikheeva G, Gelovani J, *et al.* Modification of adenovirus capsid with a designed protein ligand yields a gene vector targeted to a major molecular marker of cancer. *J Virol*, 2008, **82**(2): 630–637
- [27] Vernet E, Konrad A, Lundberg E, *et al.* Affinity-based entrapment of the HER2 receptor in the endoplasmic reticulum using an affibody molecule. *J Immunol Methods*, 2008, **338**(1–2): 1–6
- [28] Vernet E, Lundberg E, Friedman M, *et al.* Affibody-mediated retention of the epidermal growth factor receptor in the secretory compartments leads to inhibition of phosphorylation in the kinase domain. *Nat Biotechnol*, 2009, **25**(6): 417–423

An Engineered Affinity Protein-affibody

LI Shuang, HAO Zhi-Ming*

(The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract Affibodies are a new class of engineered affinity proteins derived from staphylococcal protein A (SPA) B domain. B domain is composed of 58 amino acids with a molecular mass of 6.5 ku and has a three-helical bundle structure. Thirteen amino acid positions in helix 1 and helix 2 of B domain can be randomly mutated to construct an affibody library without obvious compromise in its structural stability. Theoretically, this library contains affibodies specific to any given target. Using affinity panning, a specific affibody can be obtained. Affibody has some functional similarities with antibody. However, compared with antibody, affibody has some outstanding properties. Affibody can be obtained by *in vitro* selection and can be produced in large scale by chemical synthesis or prokaryotic expression. The smaller molecular size confers its higher tissue penetrativity and faster circulation clearance. Affibody has a higher physical and chemical stability than antibody. In addition, affibody can be cross-linked with or fusion co-expressed with reporter molecules such as fluorescent protein, biotin and so on. This class of engineered affinity proteins has been used in detection, separation, and purification of target proteins and, might be extensively applied in experimental diagnosis, molecular imaging and targeted therapeutics in the future.

Key words affibody molecule, artificial mutation, *in vitro* selection, molecular imaging

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00269

*Corresponding author.

Tel: 18991232223, E-mail: haozhm@yahoo.com.cn

Received: June 15, 2011 Accepted: August 22, 2011